Aus dem Medizinischen Strahlungsinstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Bauer

Autoradiographische Untersuchungen der DNS-Synthese an strahleninduzierten Riesenzellen in HeLa-Kulturen nach Elektronen- und Röntgenbestrahlungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HANS EBERHARD REICHENMILLER
aus Tübingen

1963

7479

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Aus dem Medizinischen Strahlungsinstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Bauer

Autoradiographische Untersuchungen der DNS-Synthese an strahleninduzierten Riesenzellen in HeLa-Kulturen nach Elektronen- und Röntgenbestrahlungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HANS EBERHARD REICHENMILLER
aus Tübingen

1963

Dekan: Prof. Dr. Dr. E. Fröhlich

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Gärtner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauer

Druckerei Scheel, Oeffingen/Stuttgart

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 7

Material und Methode 9

Ergebnisse

I. 1. Zytomorphologische Ergebnisse 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung 12

2. Autoradiographische Ermittlung der prozentualen Markierung aller Zellen im Gesamtzeitraum von 12 Tagen 13

3. Zytomorphologische Ergebnisse aus den 12-Tage-Kulturen im Hinblick auf das Verhalten der Riesenzellen 14

II. Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchung H^3-Thymidin-markierter HeLa-Riesenzellen in 12-Tage-Kulturen 15

Besprechung der Ergebnisse 17

Zusammenfassung 19

Abbildungen 21

Schrifttum 23

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0071

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

EINLEITUNG

Die Erforschung der Strahlenwirkung an Zellkulturen aus normalen und malignen Ausgangsgeweben bietet den Vorteil, daß verschiedene Strahlenqualitäten und -dosen ausgetestet werden können, da sie an bestimmten Zellpopulationen genau definierbare Wachstumsstörungen hervorrufen. Eine Zellkultur aus Zellen eines menschlichen Portiokarzinoms [1a, 2]) stellt der HeLa-Stamm dar. An ihm hat H. Gärtner[3]) die Unterschiede zwischen konventionellen Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen des 15 MeV-Beatrons in ihrer strahlenbiologischen Wirksamkeit aufgezeigt. Es wurden als dosisabhängige Veränderungen die Mitosenzahl, das Zahlenverhältnis der einzelnen Kernteilungsstadien, die abnormen Kernteilungen, die nekrobiotischen Zellvorgänge und die Riesenzellfrequenz erfaßt. Dabei fiel besonders auf, daß die Riesenzellen nach Elektronenbestrahlung eine signifikant größere Zunahme erfuhren als nach gleich dosierter Röntgenbestrahlung und daß die protrahiert verabfolgte Bestrahlung einen eindeutig stärkeren Effekt erzielte als die zeitlich konzentrierte. Das Phänomen der Riesenzellentwicklung erklärt Peters[4]) dahingehend, daß durch die Bestrahlung die Fähigkeit zur Zytoplasmateilung verlorengegangen ist, die Zellen aber dennoch in der Lage sind, ihre Kernsubstanz auf endomitotischem Wege zu vervielfachen. Von Zollinger[5]) werden die mehrkernigen polyploiden HeLa-Riesenzellen ebenfalls auf endomitotische Vorgänge zurückgeführt unter der Annahme, daß es sich dabei um Folgen von Letalmutationen oder von anderen zytochemischen Veränderungen handelt, welche den Mitoseablauf früher oder später durch Chromosomenschäden grundlegend stören.

Um über Entstehung und Verhalten dieser HeLa-Riesenzellen weitere Aufschlüsse zu bekommen, soll in dieser Arbeit ein Einblick in ihre DNS-Synthesevorgänge unter Heranziehung einer isotopenmarkierten Kernsubstanz (Tritium-Thymidin) und deren autoradiographischen Nachweises gewonnen werden.

Über die Wachstumseigenschaften und die Reaktionsweise der HeLa-Zellen auf verschiedene Noxen, die man vor der Bewertung der Ergebnisse an bestrahlten Kulturen kennen muß, sei zunächst noch folgendes aus dem Schrifttum berichtet: Hsu[6]) stellte an Hand von 2000 ausgezählten Zellen fest, daß die Mitoseaktivität in unbestrahlten HeLa-Kulturen nach der Explantation von Tag zu Tag abnimmt und dabei Differenzen zwischen Zentrum und Peripherie der Kulturen bestehen, was bei der Auszählung insofern berücksichtigt werden muß, als man entweder grundsätzlich in ein und derselben Zone auszählt oder aber gleichmäßig über alle Areale und den Zeitpunkt nach der Explantation in Rechnung stellt. Yamada[7]) beobachtete (ebenfalls an unbestrahlten Kulturen) eine nicht ganz gesicherte Wachstumsverzögerung im Sinne einer vorübergehend verzögerten Zunahme der Gesamtzellzahl mit einem relativen Minimum 12 Stunden nach der Explantation; ihr folgt dann eine sogenannte logarithmische Phase (2. bis 5. Tag nach der Explantation) mit einem Mitosen-

anstieg auf 2,9% der Gesamtzellzahl und eine sogenannte stationäre Phase mit dem Ausgangswert von 1,0% Mitosen. Diese aus 2000 Zellen ermittelten Werte hängen stark von den Kulturbedingungen ab. Takano, der in HeLa-Zellkulturen 2—3%, in HeLa-Zellsuspensionen 2% Mitosen angibt [8a]), hat mit Hilfe eines Okulargitters das Flächenwachstum der gesamten Kultur, das bis zum 30. Tag noch kontinuierlich fortschreitet, verfolgt.[8b]) Er fand eine ansteigende Wachstumsphase bis zum 8. Tag, die der logarithmischen Phase entspricht. Zur Verhaltensweise der HeLa-Zellen auf verschiedene Hemmfaktoren eines ungünstigen umgebenden Mediums hat Rose[9]) vor allem im Phasenkontrastmikroskop und bei der Lebendbeobachtung sichtbare Zellveränderungen mit Vacuolen- und Granulabildung beschrieben, die vor der Teilung einer Zelle zurücktreten. Diese Veränderungen sollen sowohl Zeichen eines intrazellulären Digestivmechanismus als auch Degenerationszeichen sein und werden Pinocytose genannt. Nitta[10]) hat eine Schädigung von HeLa-Kulturen mit mehreren chemischen Substanzen (Stickstoff-, Aethylen-, Pyrimidin- und Purinderivate; Antibiotica) durchgeführt und ähnliche Erscheinungen wie nach hochdosierter Bestrahlung festgestellt. Die Einwirkung von Viren auf HeLa-Kulturen wurde von Cieciura, Marcus und Puck[11]), von Fukumi[12]), von Gey[1b]) und anderen untersucht. Hierbei erwiesen sich die Riesenzellen am anfälligsten. Puck[13b]) meint, daß die erhöhte Virusvermehrung in den strahlenprovozierten Riesenzellen auf eine Fähigkeit zur Biosynthese auch hochkomplexer Einheiten hindeute. Der eigentliche Reproduktionsmechanismus müsse aber defekt sein, da selbst nach dreiwöchiger optimaler Kultivierung keine Mitose mehr zu sehen ist. Die zytologischen Veränderungen laufen in Korrelation zur Virenvermehrung ab. Puck fand in bestrahlten menschlichen Epithelzell- und Fibroblastenkulturen mehrkernige Riesenzellen, die er als Produkte derselben radiobiologischen Vorgänge ansieht, wie sie zur Entstehung der HeLa-Riesenzellen führen[13a]), nämlich Inaktivierung der Reproduktionsfähigkeit durch die Bestrahlung infolge Zerstörung des genetischen Apparates. Weiterhin hat er von strahlengeschädigten HeLa-Zellsuspensionen ausgehende Ein-Zellkulturen angezüchtet und an ihnen die Überlebensrate der Klonenbildung aus einer Zelle sowie Störungen des Kernstoffwechsels und des Wachstums, der Koloniemorphologie und der Chromosomenzahlen als charakteristisch nachgewiesen. Eine veränderte Strahlensensibilität (Strahlenresistenz) dieser Kulturen wurde nicht beobachtet. Bei Dosen von über 1000 r bis zu 20000 r fand Puck wieder ein Abfallen der Tumor-Riesenzellfrequenz. Es wird auch auf die überzeugende Analogie im Auftreten von Riesenzellen bei bestrahlten Karzinomgeweben in vivo hingewiesen.

MATERIAL UND METHODE

Bezüglich der Zellzüchtungsmethode, wie sie am Strahleninstitut Tübingen gehandhabt wird, darf auf die ausführliche Darstellung von Peters[4]) verwiesen werden. Zur Durchführung der Versuche mußte die Züchtungsmethode im Hinblick auf die zytologische Auswertung modifiziert werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und Waschen mit wenig Nährmedium aufgenommen und mit Pipetten auf schmale Deckgläschen aufgebracht (Explantation). Drei Stunden nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium auf 2 ccm aufgefüllt und dann mit dem Rollen begonnen. Aufgrund der Kohäsionskräfte des Mediums haften die Deckgläser am Reagenzglas, so daß im Laufe der Umdrehung des Rollers ein Wechsel von Medium und Luft für die Kultur gewährleistet ist. Nach einer Bebrütung von 48 Stunden im Rollapparat bei 37° C erfolgte die Bestrahlung.

Wir bestrahlten die eine Versuchsreihe mit Röntgenstrahlen (200 kV, 8 mA, 1 mm Cu-Filter, Tubus 20×40 cm, Abstand 40 cm), die andere mit schnellen Elektronen (15-MeV-Betatron: 15,8 MeV, 16 μ A, Streufolie Nr. 8, Tubus 8×12 cm, Abstand 40 cm) und zwar jeweils mit Dosen von 250 r und 1000 r bei einer angeglichenen Dosisleistung von 40 r/min. Die exakte Dosis wurde im Leerversuch vorgemessen und in den Hauptversuchen in der Präparatebene integrierend mitgemessen. Jede der vier Bestrahlungsserien wurde in drei verschiedene Fixierungszeitpunkte: 9^h, 24^h und 12^d, jeweils vom Ende der Bestrahlung an gerechnet, aufgeteilt. Somit haben wir 12 Meßpunkte. Diese Bestrahlungs- und Fixierungsdaten wurden in Anlehnung an die früheren Arbeiten von Gärtner[3a—f]) gewählt, um bei den Ergebnissen vergleichbare Werte zu erhalten.

Vor Fixierung der Präparate mit Bouinscher Lösung wurde dem Nährmedium 6 Stunden lang H^3-Thymidin in einer Konzentration von 0,01 μ C/ml zugesetzt[14b]). Der an Thymidin gebundene β-Strahler H^3 [15b, 16a, b]) (Fa. Schwarz Bio-Research, Inc., Mt. Vernon, N.Y.) dient zur selektiven Markierung der DNS im Zellkern[17, 18, 19, 20, 21]). Die 6stündige Zusatzzeit wurde aus Vorversuchen, in denen 3^h, 6^h und 9^h lang jeweils vor Fixierung der Zellen H^3-Thymidin zugesetzt worden war, ermittelt. Nach 6^h ist der H^3-Index von 30% [16a, b]) erreicht, d. h. daß 30% aller Zellen markiert sind. Dieser Wert hat nach 9^h nicht mehr zugenommen. Die DNS-Synthesezeit entspricht dem Produkt aus H^3-Index und Generationszeit[22, 23, 24]) (bei HeLa-Zellen bis etwa 20^h) und beträgt demnach rund 6^h [14a]). Zu jedem bestrahlten Präparat mit H^3-Thymidinzusatz wurden bestrahlte Kontrollen ohne, sowie unbestrahlte Kontrollen mit und ohne H^3-Thymidinzusatz unter sonst gleichen Bedingungen angefertigt, so daß zu jeder Versuchsserie drei Kontrollserien gehörten.

Die Verarbeitung der fixierten Präparate erfolgte nach der Stripping-Film-Methode[25, 26, 27, 28]). Der Film wurde mit der Schichtseite direkt auf die vorwiegend einschichtige Zellage der Deckgläschen gebracht. Er haftete nach dem Antrocknen ohne Hilfsmittel so fest, daß beim späteren Entwicklungsvorgang

und der nachfolgenden Färbung mit Hämalaun nach Mayer[29]) die Filme sich niemals ablösten. Die Expositionszeit von 12 Tagen bei 4° C[30]) erwies sich aus Vorversuchen für unsere Zwecke am günstigsten. Zum Schluß wurden die Präparate mit Gelatinol eingedeckt, da es durch den Film zur Zellschicht vorzudringen vermag.

Zur Auswertung lagen 96 Präparate vor, die sich auf jeden der oben angeführten 12 Meßpunkten folgendermaßen verteilen:

2 bestrahlte tritiumhaltige Präparate,
2 bestrahlte tritiumfreie Kontrollen,
2 unbestrahlte tritiumhaltige Kontrollen und
2 unbestrahlte tritiumfreie Kontrollen,

so daß also je 2 Präparate den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren. Pro Präparat wurden 1000 Zellen ausgezählt, also pro Meßpunkt und pro Kontrolle 2000 Zellen, ausgenommen die 12-Tagepräparate, die mit 1000 r Röntgen- oder 1000 r Elektronenstrahlen bestrahlt waren. In den letzteren lag die Riesenzellfrequenz so hoch, daß es arbeitsmäßig günstiger war pro Präparat 50 Riesenzellen auszuzählen, also pro Meßpunkt 100 Riesenzellen.

Um einen konstanten Maßstab für die Klassifizierung einer Zelle als Riesenzelle zu erhalten, wurden die Kerngrößen gemessen und ihre Volumina berechnet. In der Annahme, die Kerne seien ideale Kugeln, sind die Durchmesser summen[15a, 24, 31, 32, 33]) (Längsdurchmesser + darauf senkrecht stehender Querdurchmesser) addiert und durch 4 dividiert worden. Damit hat man den Radius der angenommenen Kugel und kann das Volumen nach $V = 4/3\,\pi\,r^3$ ausrechnen. Wenn man die so ermittelten Werte aus 100 Zellkernmessungen logarithmisch aufträgt, so erhält man eine Kerngrößenfrequenzkurve[31]) mit einer Normalverteilung in Form der Gaußschen Glockenkurve, deren Scheitelpunkt die statistisch häufigste Durchschnittsgröße in unbestrahlten 9h-Kontrollpräparaten darstellt. Die Durchmessersumme eines solchen Kerns beträgt 29 μ, das Kernvolumen $1{,}6 \times 10^3\ \mu^3$. Die Fußpunkte der Kurve liegen beim $^1/_{16}$fachen und beim 16fachen des Kernvolumenwertes am Scheitelpunkt. Kerne ab 74 μ Durchmessersumme wurden als Riesenzellkerne gewertet, da sie außerhalb des oberen Fußpunktes liegen. Eine weitere Unterteilung der Riesenzellen in drei Kerngrößenklassen (der größte Kerndurchmesser mit 260 μ wurde in einer mit 1000 r Elektronen bestrahlten 12d-Kultur gesehen) erwies sich später als ungerechtfertigt, da die extrem großen Kerne zahlenmäßig sehr gering auftreten und außerdem autoradiographisch keine erkennbaren Unterschiede zeigen. Dagegen konnte aus der gesonderten Betrachtung ein- und mehrkerniger Riesenzellen eine brauchbare Aussage gemacht werden. Bei mehrkernigen Zellen wurden nach Möglichkeit die einzelnen Kernmaße getrennt ermittelt oder aber der gesamte Kernkomplex sinngerecht als eine Kugel gewertet[15a]). Obwohl diese Methode etwas ungenau ist, dürfte sie aber für den hier benötigten Zweck noch ausreichende Vergleichsmaßstäbe liefern.

Über die Menge des in einen Zellkern eingebauten H^3-Thymidins gibt die Anzahl der geschwärzten Emulsionskörner Aufschluß. Zur Bestimmung dieser Kornzahl verwendeten wir ein Netzokular (Kantenlänge bei 1250facher Ver-

größerung entspricht 7,3 μ). Dabei wurde der Mittelwert aus vier ausgezählten Quadraten über dem Kern einer Riesenzelle sowie über der Umgebung der Zelle (background) ermittelt. Die Subtraktion beider Mittelwerte ergab die Schwärzungszahlen; Kerne mit 4 und mehr Schwärzungskörnern pro Netzquadrat wurden als markiert gezählt. Dieses Hilfsmittels, bei dem nicht sämtliche Körner über einem markierten Kern gezählt wurden, bedienten wir uns aus zwei Gründen. Einmal ist es zu schwierig, alle Körner über einem größeren Riesenzellkern auszuzählen (mehrere hundert Körner), zum anderen wird infolge der großen Variabilität dieser Kerne in Form und Größe ein Vergleich absoluter Kornzahlen bedeutungslos für die Beurteilung des H^3-Thymidineinbaus.

ERGEBNISSE

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in zwei Teilen. Im ersten Teil wird über die zytomorphologischen und autoradiographischen Ergebnisse aus den 9^h- und 24^h-Präparaten im Vergleich mit Arbeiten von H. Gärtner und von Painter und über die zytomorphologischen Ergebnisse aus den 12^d-Präparaten berichtet. Im zweiten Teil folgen die Ergebnisse der autoradiographischen Auswertung H^3-Thymidinspeichernder Riesenzellen in 12^d-Präparaten. Sie führen zur Behandlung der Kernfrage dieser Arbeit, der DNS-Synthese strahleninduzierter HeLa-Riesenzellen nach Elektronen- und Röntgenbestrahlungen.

I.

1. Zytomorphologische Ergebnisse 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung.

a) Die Tabelle 1 unterrichtet über die Zahl der **Mitosen** pro 2000 Zellen für den Fixierungszeitpunkt „9 Stunden post irradiationem".

Tabelle 1 Zahl der Mitosen pro 2000 Zellen in bestrahlten und unbestrahlten 9^h-Präparaten teils mit, teils ohne H^3-Thymidinzusatz.

		bestrahlt		unbestrahlt	
		ohne H^3	mit H^3	ohne H^3	mit H^3
Rö	250 r	14	11	55	54
Rö	1000 r	2	5	65	62
El	250 r	42	51	58	44
El	1000 r	7	13	52	69

Zunächst zeigt sich, daß H^3-Thymidin allein keine Mitosenhemmung induziert. Somit darf die Konzentration, in der es zugesetzt worden war, als niedrig genug angesehen werden, und die folgenden Ergebnisse dürfen als Effekte der verwendeten Strahlenarten gewertet werden.
Nimmt man nun noch die Mitosenzahlen des 24^h-Wertes hinzu und errechnet die Dosisäquivalentfaktoren [3c, 34]), so ergibt sich die Tabelle 2.

Tabelle 2 Relative biologische Wirksamkeit schneller Elektronen bezogen auf gleiche Dosen Röntgenstrahlen angeglichener Dosisleistung unter Zugrundelegung der Mitosenfrequenz. Die rechte Spalte enthält Vergleichswerte aus einer Arbeit von H. Gärtner[3c]). Die Ausgangsspannungen der Strahlen stehen in Klammern.

Dosis	RBW (Rö/El 40 r/min)	
	(200kV/15,8 MeV)	(184kV/15 MeV) Gärtner
250 r	0,30	0,54
1000 r	0,76	0,80

Die zahlenmäßige Differenz stellt keinen grundsätzlichen Unterschied dar und ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei Gärtner[3c]) mehr Beobachtungszeitpunkte (8 bis 10) in diese Zahlen eingehen. Es soll hier nur gezeigt werden, daß die Kulturen in beiden Untersuchungen eine gleiche Reaktionsweise zeigen und daher auch alle folgenden Ergebnisse an die vorliegenden Arbeiten von Gärtner angereiht werden können. Die Mitosenfrequenz von 2,5—3% (unbestrahlte Kulturen) stimmt mit den von Peters[4]) und anderen[6, 7]) genannten Werten überein.

b) Hinsichtlich der **nekrobitischen Zellvorgänge** im Zeitraum bis 24 Stunden erwies sich die 1000 r Elektronenbestrahlung deutlich wirksamer als die gleiche Dosis konventioneller Röntgenstrahlen. Bei der niederen Dosis von 250 r konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit beider Strahlenarten gefunden werden (vgl. Gärtner[3f]).

c) Die **Riesenzellzahl** erreicht innerhalb von 24 Stunden lediglich in den mit 1000 r Elektronen bestrahlten Präparaten 1% der Gesamtzellzahl. Verwertbare Riesenzellfrequenzsteigerungen finden sich erst in den 12^{d}-Präparaten, die weiter unten näher erörtert werden sollen.

2. Autoradiographische Ermittlung der prozentualen Markierung aller Zellen im Gesamtzeitraum von 12 Tagen.

Es fällt auf, daß die Markierung in den bestrahlten 9^{h}-Präparaten höher liegt als in den unbestrahlten. In Tabelle 3 wird die prozentuale Markierung als Differenz zwischen beiden Reihen ausgedrückt. Von 2000 Zellen der unbestrahlten Kontrollen sind etwa 30% markiert (vgl. Painter[14a]).

Tabelle 3 H^3-Thymidinaufnahme in die Kerne von bestrahlten HeLa-Zellen verglichen mit unbestrahlten Kontrollen. Die Zahlen geben den Prozentsatz markierter Zellen als Differenz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Kulturen an.

	Rö 250 r	Rö 1000 r	El 250 r	El 1000 r
9 Stunden	+ 14,2%	+ 13,2%	+ 10,4%	+ 5,4%
24 Stunden	— 4,0%	— 7,5%	— 6,7%	— 9,0%
12 Tage	— 10,5%	— 10,8%	— 9,8%	— 13,4%

3. Zytomorphologische Ergebnisse aus den 12-Tage-Kulturen im Hinblick auf das Verhalten der Riesenzellen.

Riesenzellfrequenz, Mitosen und Nekrobiosen von Riesenzellen, Größen- und Formvergleiche der Riesenzellkerne sind Gegenstand der nachfolgenden Darstellung.

a) Der Anteil der HeLa-Riesenzellen an der Gesamtzellzahl 12 Tage nach Bestrahlung nimmt in den einzelnen Reihen erheblich zu. Dabei erweist sich die 1000 r Elektronenbestrahlung am wirksamsten; es folgen mit abnehmendem Effekt die 1000 r Röntgen-, die 250 r Röntgen- und die 250 r Elektronenstrahlen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von H. Gärtner[3f]). (Tabelle 4)

Tabelle 4 Mittlere Frequenz von Tumorriesenzellen in HeLa-Kulturen 24^h und 12^d nach Einwirkung von 200 kV-Röntgen- und 15,8 MeV-Elektronenstrahlen mit Dosen von 250 r und 1000 r bei einer angeglichenen Dosisleistung von 40 r/min.

	Rö 250 r	Rö 1000 r	El 250 r	El 1000 r	Kontrollen
24 Stunden	0,4%	0,6%	0,6%	1,0%	0,5%
12 Tage	3,5%	14,6%	2,5%	26,5%	1,0%

b) Mitosen wurden in den Gruppen der einkernigen und mehrkernigen Riesenzellen bis zu 8% beobachtet. In den einkernigen Riesenzellen bilden sich deutliche Prophasen, sowie in der Metaphase Di- und Triasterformen, während in den mehrkernigen Zellen nur beginnende Prophasen einzelner Kerne in Erscheinung treten. In den unbestrahlten Kontrollpräparaten liegt die Mitosenfrequenz bei 2—3%. Die erhöhte Mitosenfrequenz bei den strahleninduzierten Riesenzellen ist nicht auf eine gesteigerte Mitosenaktivität, sondern auf eine Verlängerung der Mitosenablaufzeit zurückzuführen.

c) Die Nekrobiosen der Riesenzellen in Form von Pyknosen, Chromatolysen und Karyorhexis wurden nicht gesondert ausgewertet, da sich im einzelnen nicht immer feststellen läßt, wie groß die Zelle lebend war und ob die Zerfallsprodukte von einer Riesenzelle stammen. Nach statistischen Ergebnissen sind jedoch etwa $^1/_3$ aller nekrobiotischer Zelltrümmer auf zugrundegegangene Riesenzellen zurückzuführen (Gärtner[3f]).

d) Bezüglich der Größenverteilung der Riesenzellkerne sind keine strahlenabhängigen Unterschiede festzustellen, was darauf hindeutet, daß die Riesenzellbildung zwar mehr oder weniger häufig ausgelöst werden kann, dann aber einem feststehenden Ablauf unterliegt.

e) Bei der getrennten Auswertung der ein- und mehrkernigen Zellen konnten in den bestrahlten Präparaten einige strahlen- und dosisabhängige Verteilungsunterschiede herausgefunden werden, wie aus der Tabelle 5 ersichtlich wird.

Tabelle 5 Prozentuale Aufteilung der Riesenzellen in einkernige und mehrkernige bei HeLa-Kulturen 12 Tage nach verschieden dosierter Röntgen- und Elektronenbestrahlung.

	Rö 250 r	Rö 1000 r	El 250 r	El 1000 r	Kontrollen
einkernig:	53 %	47 %	56 %	41 %	55 %
mehrkernig:	47 %	53 %	44 %	59 %	45 %

Die Provokation der mehrkernigen Riesenzellen bezüglich Strahlenart und Dosis verläuft analog zur strahleninduzierten Steigerung der Riesenzellfrequenz (vgl. Tabelle 4), da sie dieselbe Wirkungszunahme von den 250 r Elektronen- über die 250 r Röntgen-, die 1000 r Röntgen- bis zu den stärkst wirksamen 1000 r Elektronenstrahlen aufweist.

II.

Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchung H^3-Thymidinmarkierter HeLa-Riesenzellen in 12-Tage-Kulturen.

Die Markierung der Riesenzellen, die den wesentlichen Abschnitt dieser Untersuchung bildet, soll nun im einzelnen dargelegt werden. Zunächst werden alle Zellen mit ausreichend markiertem Kern als thymidinspeichernd gewertet. Auf die Unterschiede in der Menge der H^3-Thymidinaufnahme, die sich in der Schwärzungsdichte des Autoradiographie-Films ausdrückt, wird anschließend eingegangen.

Als erstes ist festzustellen, daß nach der 6stündigen H^3-Inkubationszeit keine markierte Riesenzellmitose zu sehen war. Dies beruht auf einer Verlängerung der DNS-Synthesephase + prämitotischen Ruhephase.

Die Riesenzellen scheinen, soweit sich das aus ihrer geringen Zahl beurteilen läßt, dieselben Markierungsbewegungen in den ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung mitzumachen wie die normalen HeLa-Zellen, also zunächst ein Anstieg über die Kontrollwerte nach 9 Stunden, danach ein Abfall unter diese nach 24 Stunden. Die Verhältnisse bei den 12-Tage-Werten, wo sie in ihrer prozentualen Markierung wieder über die Kontrollen ansteigen, ergeben sich aus der Tabelle 6.

Tabelle 6 Prozentualer Anteil der markierten Riesenzellen an der Gesamtzahl der Riesenzellen in HeLa-Kulturen 12 Tage nach verschieden dosierter Röntgen- und Elektronenbestrahlung.

Rö 250 r	Rö 1000 r	El 250 r	El 1000 r	Kontrollen
28%	28%	22%	38%	19%

Da sich möglicherweise einkernige und mehrkernige Riesenzellen hinsichtlich der H^3-Thymidinspeicherung unterscheiden, wurden beide Formen in der Tabelle 7 gesondert ausgewertet.

Tabelle 7 Prozentualer Anteil der markierten Riesenzellen an der Gesamtzahl der Riesenzellen in HeLa-Kulturen 12 Tage nach verschieden dosierter Röntgen- und Elektronenbestrahlung. Gesonderte Auswertung von einkernigen und mehrkernigen Riesenzellen (vgl. Tabelle 6).

	Rö 250 r	Rö 1000 r	El 250 r	El 1000 r	Kontrollen
einkernig:	24%	23%	18%	22%	16%
mehrkernig:	33%	32%	28%	49%	23%

Die Markierung der Riesenzellen nimmt demnach mit zunehmender Kernzahl zu, so daß eine Kultur umso mehr speichernde Riesenzellen aufweist, als sie mehrkernige Riesenzellen enthält (vgl. Tabelle 5). Als Grund dafür ist vor allem die größere Gesamtkernoberfläche anzusehen, die eine bessere Resorption mit sich bringt. In einer markierten mehrkernigen Riesenzelle waren fast durchweg alle Einzelkerne markiert, vorausgesetzt daß sie nahe genug an der Filmemulsion lagen. Dies deutet darauf hin, daß diese einzelnen Kerne jeweils in der gleichen Phase des Generationszyklus stehen.
Hinsichtlich der Anzahl geschwärzter Emulsionskörner als Maßstab für die in die Riesenzellkerne eingebaute H^3-Thymidinmenge lassen sich keine Unterschiede nach den verschiedenen Strahlenarten und Dosen feststellen. Einschränkend muß jedoch betont werden, daß für die Beantwortung dieser Frage größere Untersuchungsreihen notwendig sind.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die vergleichende Bestrahlung von HeLa-Kulturen mit konventionellen Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen konnte die früheren Ergebnisse von Gärtner hinsichtlich der Mitosenhäufigkeit und der Nekrobiosen innerhalb der ersten 24 Stunden post irradiationem bestätigen. Die Riesenzellfrequenz weist nach 12 Tagen bezüglich Strahlenart und Dosis dieselbe Zunahme auf, wie sie Gärtner gefunden hat. Die geringen Zahlendifferenzen dürften darauf zurückzuführen sein, daß die Grenze für die Klassifizierung als Riesenzelle in der vorliegenden Arbeit an Hand der Kerngrößenverteilungskurve etwas abweichend festgelegt worden ist.

Was den Anteil markierter Zellen an der Gesamtzellzahl im Zeitraum bis 24 Stunden nach Bestrahlung betrifft, konnte in Übereinstimmung mit Painter zunächst ein Ansteigen in den bestrahlten Kulturen verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen beobachtet werden. Painter hat nun an Hand von Berechnungen zwei Theorien zu dieser in HeLa-Kulturen gefundenen strahleninduzierten Markierungszunahme entwickelt. Entweder müsse ein vermehrter Eintritt von Zellen aus der postmitotischen Ruhephase in die DNS-Synthesephase stattfinden, oder es müsse ein verlängertes Verharren der Zellen in der DNS-Synthesephase vorliegen. Das letztere scheint uns wahrscheinlicher zu sein.

Versucht man die Entstehung der Riesenzellen durch ionisierende Strahlen zu erklären, so muß grundsätzlich die Hemmung der Mitose als unabhängig von der Hemmung der DNS-Neubildung angesehen werden. Dabei zeigt der Zellteilungsmechanismus in manchen Fällen eine höhere Strahlenempfindlichkeit als die DNS-Synthese. Innerhalb eines bestimmten Strahlendosisbereiches wird dann die Mitose blockiert, während die DNS-Verdopplung noch weiter geht, so daß es zur Ausbildung polyploider Zellen kommt (Harbers[22]). Man vermutet, daß die strahleninduzierte Mitosenhemmung auf einer Schädigung freier Sulfhydrilgruppen beruht, deren Gegenwart für den Ablauf der normalen Zellteilung insbesondere zur Ausbildung der Mitosespindel unerläßlich ist. Painter diskutiert die Riesenzellbildung in ähnlicher Weise als Folge einer exzessiven DNS-Bildung mit Polyploidie, die wiederum eine Folge der durch die Bestrahlung verlängerten DNS-Synthesephase darstelle, wie oben schon erwähnt wurde. Die Riesenzelle macht den Versuch einer mitotischen Teilung, die sie aber bei zunehmender Kernzahl immer weniger weit vorantreiben kann. Die Zunahme der Kernzahl geschieht vermutlich auf endomitotischem Wege, nachdem eine verstärkte Produktion von Kernsubstanzen vorausgegangen ist. Welche Schäden am genetischen Apparat der HeLa-Riesenzellkerne auftreten, läßt sich im einzelnen nicht sagen. Sicher ist zwar, daß die DNS-Synthese durch die vorgenommene Bestrahlung nicht zum Stillstand gebracht wurde. Dies geht aus der Markierung dieser Kerne hervor. Man kann sogar aus den Markierungsverhältnissen in den ersten 24 Stunden folgern, daß sich die Riesenzellen während dieser Zeit biologisch prinzipiell genau so

verhalten, wie die normalen HeLa-Zellen. Es ist aber denkbar, daß das aus DNS-Ketten aufgebaute Chromosomenskelett Veränderungen im Sinne von Mutationen erleidet, die sich ihrerseits wieder auf den Zell- und Kernstoffwechsel auswirken.

Unsere Untersuchungen haben in einzelnen Fällen auch markierte Zerfallsprodukte nekrobiotischer Zellen erkennen lassen. Hier wird entweder der Stoffwechsel einzelner Zellen in Nekrobiose noch so weit erhalten sein, daß eine Aufnahme von H^3-Thymidin erfolgen kann, wenn auch keine Integration zu normalen DNS-Ketten mehr möglich ist, oder aber die Zelle ist kurz nach dem Einbau des Isotops zugrunde gegangen.

Kurzgefaßt kann man den Weg, den die Riesenzelle bis zu ihrem Untergang beschreitet, etwa folgendermaßen beschreiben: Die einkernigen Riesenzellen dürften endomitotisch entstehen, d. h. Vermehrung der Kernsubstanz unter Ausbleiben der Kern- und Zytoplasmateilung. Die mehrkernigen Riesenzellen können nur über unvollkommene, zeitlich verlängerte Mitosen mit Di- und Triasterbildungen unter Ausbleiben der Zytoplasmateilung entstehen. Die reproduktive Kapazität ist aufgehoben, während die synthetische Aktivität erhalten bleibt. Die Überlebensfähigkeit dürfte graduell mit der Gesamtgröße der Zelle zusammenhängen. Von einem kritischen Volumen an, das im Einzelfall sehr verschieden sein kann, zerfallen die Riesenzellen und werden als Degenerativformen zytologisch erfaßt.

Die Ausbildung der Riesenzellen in bestrahltem Gewebe, beziehungsweise in der bestrahlten Gewebekultur kann somit nur teilweise als Anpassung, vorwiegend aber als destruktiver Strahleneffekt angesehen werden. Die Riesenzelle bleibt zwar bis zu einer gewissen Größe lebensfähig, muß letztlich aber als degenerative Zellform betrachtet werden. Diese Aussagen gelten nur für die Untersuchungen in vitro. Eine Übertragung der Befunde auf die Verhältnisse in vivo ist nicht ohne weiteres möglich, obgleich man ihnen wertvolle Anhaltspunkte entnehmen kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Riesenzellen, die in HeLa-Kulturen vor allem nach hochdosierter, protrahiert verabreichter Bestrahlung auftreten, weisen ebenso wie die übrigen Zellen in den ersten Stunden post irradiationem einen vermehrten H^3-Thymidineinbau auf als Ausdruck eines verzögerten Eintritts in die Mitose. Im weiteren Ablauf zeigen sie eine normale Kernstoffwechselaktivität. Es erfolgen aber in den Riesenzellen keine vollständigen Mitosen mehr und die Zytoplasmateilung unterbleibt. Als Ursache dafür wird eine Schädigung der für die Ausbildung der Mitosespindel notwendigen freien SH-Gruppen durch die Strahlen vermutet. Die Riesenzellen, die vorwiegend auf endomitotischem Wege entstehen dürften, zeigen eine gute H^3-Thymidinspeicherungsfähigkeit und demnach eine weitgehend ungestörte DNS-Synthese. Die Zunahme dieser mehrkernigen Riesenzellen nach Bestrahlung läuft analog der Riesenzellzunahme überhaupt und ist als irreversible Gewebsschädigung zu werten, da alle diese Zellen bei einer gewissen kritischen Kerngröße beziehungsweise Kernzahl zugrunde gehen.

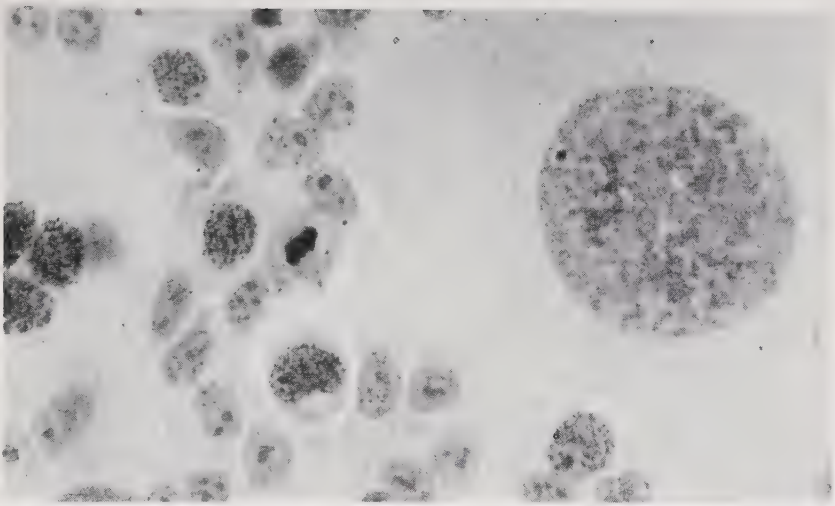

Abb. 1 Mit 250 r Röntgenstrahlen bestrahlte und 12 Tage später fixierte HeLa-Zellkultur, der 6 Stunden lang vor der Fixierung H^3-Thymidin zugesetzt war. Expositionszeit: 28 Tage. Ganz links eine dreikernige markierte Riesenzelle, in der Mitte eine Mitose (Metaphase) und mehrere markierte Zellen, rechts eine einkernige nicht markierte Riesenzelle. (Vergrößerung des 24×36-mm-Negativs: 160fach.)

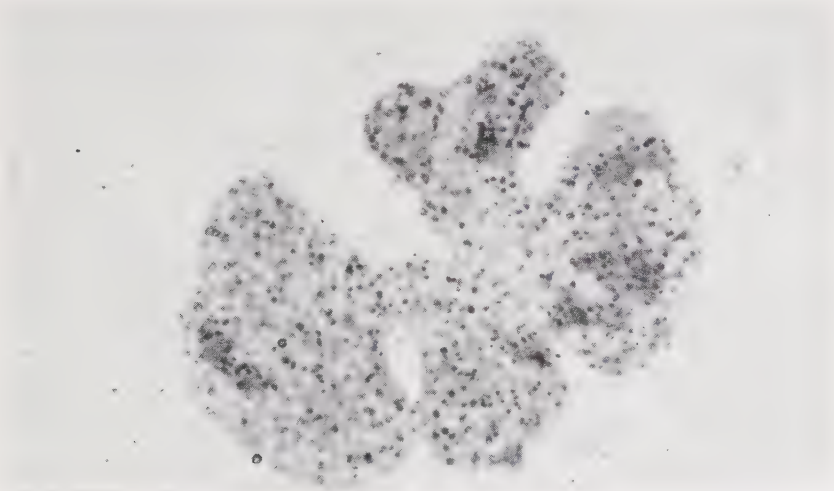

Abb. 2 Mit 1000 r Elektronen bestrahlte und 12 Tage später fixierte HeLa-Zellkultur. H^3-Thymidinzusatz wie bei Abb. 1. Expositionszeit: 12 Tage. Gelapptkernige markierte Riesenzelle. (Vergrößerung des 24×36-mm-Negativs: 400fach.)

SCHRIFTTUM

1. a) Gey, G. O., W. D. Coffmann, and M. T. Kubicek, Cancer Research **12**, 264 (1952)
   b) Gey, G. O., F. B. Bang, and M. K. Gey, Texas Rep. Biol. Med. **12**, 805 (1954

2. Leighton, J., and J. Kline, Texas Rep. Biol. Med. **12**, 865 (1954)

3. a) Gärtner, H., Strahlenther. **96**, 201 und **96**, 378 (1955)
   b) Strahlenther. **103**, 620 (1957)
   c) Strahlenther. **107**, 619 (1958)
   d) Fortschr. Röntgenstr. **88**, 45 (1958)
   e) Die Einwirkung schneller Elektronen auf Gewebekulturen des HeLa-Stammes, Betatron- und Telekobalttherapie, Springer-Verlag Heidelberg 1958, S. 131—134
   f) Strahlenther. **114**, 1 (1961)

4. a) Peters, K., Fortschr. Röntgenstr. **88**, 50 (1958)
   b) Strahlenther. **Sdbd. 43**, 373 (1959)

5. Zollinger, H. U., in F. Büchner-E. Letterer-F. Roulet: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Band 10, I. Teil, S. 248 f., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960

6. Hsu, T. C., Texas Rep. Biol. Med. **12**, 833 (1954)

7. Yamada, M., and K. Takano, Jap. J. Med. Sc. Biol. **9**, 27 (1956)

8. a) Takano, K., M. Yamada, and K. Yaginuma, Jap. J. Med. Sc. Biol. **9**, 17 (1956)
   b) Takano, K., and M. Yamada, Jap. J. Med. Sc. Biol. **9**, 41 (1956)

9. Rose, G. G., Texas Rep. Biol. Med. **15**, 313 (1957)

10. Nitta, K., Jap. J. M. Sc. Biol. **10**, 277; ibid. p. 287; p. 419; p. 429 (1957)

11. Cieciura, S. J., P. I. Marcus, and T. T. Puck, Virology, **3**, 426 (1957)

12. a) Fukumi, H., F. Nishikawa, and S. Ejima, Jap. J. M. Sc. Biol. **10**, 321 (1957)
    b) Fukumi, H., F. Nishikawa, K. Nakamura, T. Watanabe, and T. Kitayama, Jap. J. M. Sc. Biol. **10**, 407 (1957)

13. a) Puck, T. T., and P. I. Marcus, J. exp. Med. **103**, 653 (1956)
    b) Puck, T. T., D. Morkovin, P. I. Marcus, and S. J. Cieciura, J. exp. Med. **106**, 458 (1957)

14. a) Painter, R. B., and J. S. Robertson, Radiation Research **11**, 206 (1959)
    b) Painter, R. B., Lab. Invest. **8**, 278 (1959)

15. a) Firket, H., Recherches sur la synthèse des Acides Désoxyribonucléiques et la préparation a la mitose dans des cellules cultivées »in vitro«, Liège, Imprimerie H. Vaillant-Carmanne, S.A., 1957
    b) Firket, H., and W. G. Verly, Nature **181**, 274 (1958)

16. a) Hughes, W. L., and V. P. Bond, G. Brecher, E. P. Cronkite, R. B. Painter, Proc. Nat. Acad. Sci. **44**, 476 (1958)
    b) Hughes, W. L., Proc. of the Second U.N. International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy. **Vol. 25:** Isotopes in Biochem. and Physiol., Part 2. Genf 1958, pp. 203—210

17. Bacq, Z. M., P. Alexander, Grundlagen der Strahlenbiologie, G. Thieme-Verlag Stuttgart, 1958

18. Friedkin, M., D. Tilson, and D. Roberts, J. Biol. Chem. **220**, 627 (1956)

19. Reichard, B., and D. Estborn, J. Biol. Chem. **188**, 839 (1951)

20. Lajtha, L. G., Nature **173**, 578 (1954)

21. Watson, J. D., and F. H. C. Crick, Nature **171**, 964 (1953)

22. Harbers, E., Dtsch. med. Wschr. **87**, 1359 (1962)

23. Schultze, B., W. Dehlert, Science **131**, 737 (1960)

24. Fliedner, T. M., E. P. Cronkite und V. P. Bond, Schweiz. med. Wschr. **89**, 1061 (1959)

25. Boyd, G. A., Autoradiography in Biology and Medicine, Academic Press Inc. New York, 1955

26. McDonald, A. M., J. Cobb, and A. K. Solomon, Science **107**, 550 (1948)

27. Pelc, S. R., Nature **160**, 749 (1947)

28. Schmeiser, K., „Autoradiographie", in H. Schwiegk: Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie, Springer-Verlag Heidelberg, 1953

29. Romeis, B., Mikroskopische Technik, 15. Aufl., Leibniz-Verlag München, 1948

30. Fitzgerald, P. J., M. L. Eidinoff, J. E. Knoll, and E. B. Simmel, Science **114**, 494 (1951)

31. Bucher, O. und B. Horrisberger, Acta anat. (Basel) **9**, 258 (1950); Z. Zellforsch. **42**, 193 (1955)

32. Graham, R. M., and K. R. Goldie, Cancer **8**, 71 (1955)

33. Weickert, H., Schweiz. med. Wschr. **87**, 1210 (1957)

34. Rajewski, B., Strahlendosis und Strahlenwirkung, 2. Aufl., Georg Thieme-Verlag Stuttgart, 1956

Herrn Professor Dr. R. Bauer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, Frau Professor Dr. H. Gärtner, Herrn Dozent Dr. K. Peters und Herrn Dr. U. Feine für die wertvolle Anleitung und Unterstützung meinen besten Dank aussprechen.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Dr. med. Hans Reichenmiller und seiner Gattin Elfriede, geb. Muth, wurde ich am 15. Mai 1937 in Tübingen geboren. 1948 zogen meine Eltern mit mir und meinen drei Geschwistern nach Stuttgart, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1956 begann ich in Tübingen das Medizinstudium und bestand dort auch Ende Juli 1958 die ärztliche Vorprüfung. Nach zwei Auslandssemestern in Wien kehrte ich hierher zurück und beschloß mein Studium mit dem Staatsexamen im Frühjahr 1962. Augenblicklich leiste ich den chirurgischen Teil meiner Medizinalassistentenzeit in Stuttgart-Bad Cannstatt ab. Ab 1. Januar 1963 werde ich an eine geburtshilfliche Abteilung nach Zürich gehen. Die vorliegende Arbeit ist im Wintersemester 1961/62 als Preisaufgabe des Dekanatsjahres 1960/61 prämiert worden.